



พื้นที่สานเสวนาการปฏิบัติและวิจัยทางเภสัชกรรมและบริการสุขภาพ

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

Space for dialogue on practice & research on pharmacy & health care service

Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University
Editor: charoen@g.swu.ac.th
Website: <http://ejournals.swu.ac.th/index.php/dphcp>

Dialogue
healthcare service

วีระศักดิ์ สามิ^{1*}, ชุตินา กิตติเศรณี¹, สุภาฯ สกุลมานิต¹ และ
ฤทธิ์ วัฒนชัยยิ่งเจริญ²

¹ สาขาวิชาเภสัชเคมี

² สาขาวิชาชีวเภสัชศาสตร์

^{1,2} คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ อ.องครักษ์ จ.นครนายก 26120

* ติดต่อผู้พิมพ์: weerasak@g.swu.ac.th

เสวนาสารเภสัชกรรมและบริการสุขภาพ 2557;1(4):99-104

Weerasak Samee^{1*}, Chutima Kititasserani¹, Supacha Skulmanit¹
and Ritt Wattanachaiyingcharoen²

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry

² Department of Biopharmacy

^{1,2} Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Ongkharak, Nakhonnayok,
26120, Thailand

* Corresponding author: weerasak@g.swu.ac.th

Dialogue on Pharmacy and Health Care Practice 2014;1(4):99-104

นิพนธ์ต้นฉบับ

ฤทธิ์ต้านจุลชีพของสารสกัดจากดอกไม้ในประเทศไทย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: การวิจัยนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลชีพจากสารสกัดเอทานอลของดอกไม้ 30 ชนิดในประเทศไทย **วิธีการศึกษา:** ทดสอบการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค 5 ชนิด คือ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Aspergillus niger* และ *Candida albican* ด้วยวิธี Agar disc diffusion และ microbroth dilution **ผลการศึกษา:** สารสกัดจากดอกไม้ที่มีความเข้มข้นสูงสุด (333 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยเกิด inhibition zone ต่อเชื้อ *S. aureus*, *B. subtilis* และ *E. coli* แต่ไม่พบฤทธิ์ต้านจุลชีพต่อเชื้อ *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *A. niger* และ *C. albican* ส่วนสารสกัดที่มีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* คือ สารสกัดจากดอกทรงบาดาลและหางนกยูงไทย โดยมีค่า MIC เท่ากันคือ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และสารสกัดจากดอกบัวหลวงมีฤทธิ์สูงสุดในการยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* ที่ค่า MIC เท่ากันทั้งสองเชื้อคือ 1,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร **สรุป:** พบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดจากดอกไม้หลายชนิดที่มีความเข้มข้นสูงสุด สารสกัดจากดอกบัวหลวงมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงที่สุดต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli*

คำสำคัญ: ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย, ฤทธิ์ต้านจุลชีพ, สารสกัดเอทานอล, ดอกไม้, ประเทศไทย

Original Article

Antimicrobial Activity of Flower Extracts in Thailand

ABSTRACT

Objective: To evaluate antimicrobial activities of the ethanol extracts of 30 Thai flowers against pathogenic bacteria and fungi. **Methods:** The pathogenic microorganisms included 5 strains of bacteria, namely *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*, and 2 strains of fungi, specifically, *Aspergillus niger* and *Candida albican*. The crude extracts were examined for antimicrobial activity using agar disc diffusion and microbroth dilution methods. **Results:** Most flower extracts, with their highest concentrations (333 mg/ml), exhibited antimicrobial properties against *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli*, but not against *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *A. niger* or *C. albican*. The extracts of *Senna surattensis* and *Caesalpinia pulcherrima* both demonstrated the highest inhibition effect against *S. aureus* at a comparable MIC of 300 µg/ml. The highest antimicrobial effect was found in *Nelumbo nucifera* extract with an MIC of 1,200 µg/ml against *B. subtilis* and *E. coli*. **Conclusion:** Antibacterial activities were found in various flower extracts at their highest concentrations. *Nelumbo nucifera* extract exhibited the highest antibacterial activity against *B. subtilis* and *E. coli*.

Keywords: antibacterial, antimicrobial, ethanol extract, flower, Thailand

บทนำ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในประเทศเขตร้อนชื้นทำให้มีสภาพสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเติบโตของจุลชีพ จึงมักพบปัญหาการติดเชื้อและเกิดโรคระบาดหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* sp. เป็นเชื้อสาเหตุของอาการอุจจาระร่วง *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. เป็นเชื้อสาเหตุของการติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะ ส่วน *Aspergillus niger* และ *Candida albican* เป็นเชื้อราฉวยโอกาส¹ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อก่อโรคที่ผิวหนังและ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อฉวยโอกาส² เป็นต้น แม้ว่าอุตสาหกรรมการเกี่ยวข้องกับยาจะมีการพัฒนาตำรับยาปฏิชีวนะใหม่ ๆ เพื่อรองรับปัญหาดังกล่าว แต่ตัวยาที่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้นจากกระบวนการทางเคมี อาจมีสารปนเปื้อนเกิดขึ้นในระหว่างขั้นตอน

การสังเคราะห์ยา ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายในคนได้ ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงหันมาให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยการนำพืชสมุนไพรมาใช้เป็นยาเพิ่มมากขึ้นและเป็นแนวทางใหม่ในการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ^{3,4}

สำหรับประเทศไทยมีผู้ศึกษาวิจัยด้านนี้เพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้นจึงทำให้มีความหลากหลายของสายพันธุ์พืชที่สามารถนำมาศึกษาได้ โดยพืชแต่ละชนิดมีฤทธิ์ทางด้านเภสัชวิทยาที่แตกต่างกัน เช่น กานพลูแก้อาการท้องอืดช่วยขับลม คำฝอยช่วยละลายไขมันในเลือด ชะเอมแก้ไอขับเสมหะ ฟักทะลายโจรแก้ไข้ ฝรั่งใช้รักษาภาวะท้องร่วงและบิด กาหลงลดความดันโลหิต เทียนบ้านใช้รักษาอาการน้ำกัดเท้า มะเกลือขับพยาธิ ทองพันชั่งรักษากลากเกลื้อนขิงแก้อาการคลื่นไส้อาเจียน เป็นต้น⁵

รายงานการวิจัยส่วนใหญ่เน้นการศึกษาสารสำคัญจากส่วนราก ลำต้น และใบของพืช ซึ่งข้อมูลส่วนของดอกมีน้อยมาก ในต่างประเทศมีการนำสารสกัดจากดอกโรสแมรี (*Rosmarinus officinalis*) มาใช้เป็นสารกันเสียในเครื่องสำอางเนื่องจากมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน⁶ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากดอกไม้ในประเทศไทยจำนวน 30 ชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาชนิดและเอกลักษณ์ของสารสำคัญที่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์จากดอกไม้ และเป็นแนวทางในการเลือกสารสกัดจากดอกไม้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ต่าง ๆ เช่น ใช้เป็นสารกันเสียในเครื่องสำอาง อีกทั้งยังอาจใช้เป็นแนวทางพัฒนาโครงสร้างของสารสำคัญเพื่อประโยชน์ทางเภสัชกรรมต่อไป

วิธีการศึกษา

วัสดุและสารเคมี

จุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบ

1. เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่

Gram negative	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311
Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 2977

2. เชื้อรา ได้แก่

<i>Candida albican</i> ATCC 10231
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 11414

วิธีการทดลอง

1. การสกัดสารสำคัญจากดอกไม้

- นำดอกไม้ทั้ง 30 ชนิดมาล้างทำความสะอาด ผึ่งให้แห้ง หรือใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง โดยแยกเอาเฉพาะส่วนกลีบดอกและเกสรมาอบแห้ง ที่อุณหภูมิ 50 – 55 °C หรือจนกว่าจะแห้ง
- นำส่วนของพืชแห้งมาบดเป็นผง ชั่งน้ำหนักผงใส่ใน flask ขนาด 250 มล. เติม 95% เอทานอล ในอัตราส่วน 1:7 หมักครั้งละ 7 วัน จำนวน 3 ครั้ง
- นำ flask สารสกัดไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที และนำมากรองแยกสารสกัดออกด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายไประเหยเอาตัวทำละลายออกให้หมด โดยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 50 °C
- ชั่งน้ำหนักสารสกัดเข้มข้นที่ได้แล้วบันทึกน้ำหนักที่ได้ เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่มีฝาเกลียวปิดและเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

2. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity)⁷

2.1 การเตรียมเชื้อ

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB), Tryptic soy agar (TSA), Saboraud dextrose agar (SDA) และ Mueller-Hinton agar (MHA) โดยละลายในน้ำกลั่นแล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที
- ถ่ายเชื้อมาตรฐานจาก stock culture ลงใน TSB แล้วนำไป incubate เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
- นำเชื้อจาก TSB มา streak บน TSA plate เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์หรือ pure culture แยกเอาโคโลนีเดี่ยว
- ทำ subculture เชื้อโดยนำ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการมา streak บน slant แล้วนำไป incubate เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
- นำ loop เขี่ยเชื้อใส่ลงใน TSB นำไป incubate 18 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ McFarland solution No. 0.5 (การเตรียมสารละลาย McFarland solution No. 0.5 โดยใช้สารละลาย barium chloride 1.125% (w/v) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ sulfuric acid 0.36 N จำนวน 99.5 มิลลิลิตร)⁴ โดยเจือจางด้วย TSB

2.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion⁸

- เตรียม agar plate โดยใช้ Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร โดยเท TSA ที่ autoclave แล้ว ปริมาตร 12 มิลลิลิตร ตั้งไว้ให้แข็งตัว
- นำสารละลายเชื้อ (เทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland solution No. 0.5) spread บน agar plate โดยใช้ cotton swab ชุบสารละลายเชื้อ แล้วกระจายให้ทั่วผิวหน้า TSA จนสารละลายหมด
- เตรียมสารสกัดจากดอกไม้ตัวอย่างโดยชั่งน้ำหนักชนิดละ 0.1 กรัมละลายด้วย 95% เอทานอล 200 ไมโครลิตร ใน microcentrifuge tube นำไป sonicate 20 นาที ให้สารสกัดละลายได้ดี
- ดูดสารละลายของสารสกัดตัวอย่าง ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.9 เซนติเมตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว) รองนึ่ง วาง paper disc บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมงโดยทำ negative และ positive control ด้วย paper disc ที่จุ่มด้วยตัวทำละลาย และยาปฏิชีวนะตามลำดับ
- อ่านผล antibacterial activity และ antifungal activity โดยวัด inhibition zone และบันทึกผลในหน่วยมิลลิเมตร

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี microbroth dilution⁹

- เตรียมสารละลายเชื้อ (เทียบความขุ่นของเชื้อเท่ากับ McFarland solution No 0.5) และสารละลายสี tetrazolium เติมลงใน TSB ในอัตราส่วน 5:5:90 เขย่าผสมให้เข้ากัน

จากนั้นนำไปหยอดลงใน 96 microwell plate โดยแต่ละหลุม ให้มีปริมาตร 100 ไมโครลิตร

- เตรียมสารสกัดตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 19,200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1:2 ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 9,600, 4,800, 2,400, 1,200, 600, 300 และ 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ
- แต่ละ 96 microwell plate ประกอบด้วย positive control, negative control และ sample โดย positive control จะเติมสารละลายของตัวอย่างไป 100 ไมโครลิตร ส่วน negative control เติม media อีก 100 ไมโครลิตร และ sample ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างละ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
- บันทึกผลการทดลองโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น หากเชื่อมีการเจริญเติบโตสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีแดง เพราะใน mitochondria ของสิ่งมีชีวิตมี enzyme dehydrogenase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน tetrazolium sodium เป็น formazan ซึ่งมีสีแดงและไม่ละลายน้ำ หากสารที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้สารละลายจะไม่เกิดสี
- พิจารณาค่า MIC (Minimum inhibitory concentration)¹⁰ จากเข้มข้นแรกที่ไม่เกิดสีแดง

หมายเหตุ: สี 2,3,5-tetrazolium sodium 1% เตรียมโดย 1% ของ 2,3,5-tetrazolium sodium + 10% glucose ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.4 การหาค่า MBC (Minimum bactericidal concentration)¹¹

- เก็บสารละลายในหลุมที่สีไม่มีสีแดงมา streak ลงบน agar plate
- นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง
- พิจารณาค่า MBC จากสารละลายความเข้มข้นที่ไม่มีเชื้อขึ้น (โดยศึกษาค่า MBC เฉพาะเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli*)

ผลการศึกษา

1. การเตรียมสารสกัด

จากการสกัดสารจากดอกไม้ 30 ชนิด โดยใช้ absolute ethanol ด้วยวิธี Maceration โดยหมักครั้งละ 7 วันเป็นจำนวน 3 ครั้ง แล้วรวมสารสกัดจากการหมักทั้งสามเข้าด้วยกัน จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกให้ได้สารสกัดแห้ง พบว่าได้ปริมาณ % yield ดังตารางที่ 1 โดยสารสกัดจากดอกไม้ที่มีปริมาณสูงสุด 5 อันดับแรกคือ แพงพวยฝรั่ง (แดง) ราเพย บานบุรี พวงชมพู และพุทซ้อน ตามลำดับ โดยมีค่า % yield ดังนี้ 43.89, 43.43, 43.03, 42.50 และ 41.96% ตามลำดับ และที่มี % yield น้อยที่สุดคือ ชุมเห็ดเทศ (6.47%)

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพด้วยวิธี agar disc diffusion

การตรวจสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพเบื้องต้น โดยนำสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงสุดของสารที่สกัดได้จากดอกไม้ คือ 333 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ละลายใน absolute ethanol มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เทียบกับยามาตรฐาน tetracycline 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมี inhibition zone = 17.8 มิลลิเมตร พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกกุหลาบ

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณของสารสกัดแห้งจากดอกไม้แต่ละชนิด

No.	ดอกไม้	ชื่อวิทยาศาสตร์	Yield (%)
1	กันเกรา	<i>Fagraea fragrans</i> Roxb.	24.30
2	กุหลาบมอญ	<i>Rosa damacena</i>	24.23
3	เก็กฮวย	<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	37.13
4	ทรงบาดาล	<i>Senna surattensis</i>	26.76
5	เข็ม (เหลือง)	<i>Ixora coccinea</i>	31.59
6	เข็ม (แดง)	<i>Ixora coccinea</i>	24.70
7	คำฝอย	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	20.11
8	แค (ขาว)	<i>Sesbania grandiflora</i>	38.41
9	แค (แดง)	<i>Sesbania grandiflora</i>	29.20
10	จำปี	<i>Michelia alba</i> DC.	9.84
11	ชบา	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	26.63
12	ช้องนาง	<i>Thunbergia repens</i> L.	26.25
13	ชุมเห็ดเทศ	<i>Cassia alata</i> L.	6.47
14	ดาวกระจาย	<i>Cosmos</i> spp.	31.80
15	ทองหลาง	<i>Erythrina variegata</i> L.	11.73
16	บัวหลวง	<i>Nelumbo nucifera</i>	14.85
17	บานบุรี	<i>Allamanda cathartica</i> L.	43.03
18	บานไม่รู้โรย	<i>Limnium sinuatum</i>	6.92
19	ประดู่	<i>Pterocarpus macrocarpus</i> Kurtz	17.59
20	พวงชมพู	<i>Antigonon leptopus</i> Hook. & Arn	42.50
21	พุทซ้อน	<i>Tabernaemontana divaricata</i>	41.96
22	แพงพวยฝรั่ง (ขาว)	<i>Catharanthus roseus</i>	41.42
23	แพงพวยฝรั่ง (แดง)	<i>Catharanthus roseus</i>	43.89
24	มะลิ	<i>Jasminum Sambac</i> (L.) Aiton	14.33
25	รางจืด	<i>Thunbergia laurifolia</i> Linn.	38.68
26	ราเพย	<i>Thevetia peruviana</i>	43.43
27	สุพรรณิการ์	<i>Cochlospermum vitifolium</i>	20.90
28	หางนกยูงไทย	<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	31.03
29	อัญชัน	<i>Clitoria tematea</i> L.	24.95
30	รัก (ม่วง)	<i>Calotropis gigantea</i> L.	15.29

ทรงบาดาล เข็มแดง จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง พวงชมพู แพงพวยฝรั่งดอกสีแดง ราเพย และหางนกยูงไทย สามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ โดยมี inhibition zone ขนาด 10.5, 11.0, 10.5, 15.0, 13.0, 16.5, 10.5, 11.0, 11.5 และ 12.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกไม้ชนิดอื่นมีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าวเพียงเล็กน้อยและไม่สามารถวัดเป็นขนาดได้ชัดเจน ได้แก่ กันเกรา เก็กฮวย คำฝอย แคแดง ดาวกระจาย ทองหลาง และบานบุรี

ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus subtilis* เทียบกับยามาตรฐาน norfloxacin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งมี inhibition zone 18.0 มม. พบว่าสารสกัดเอทานอลจาก ดอกกันเกรา เข็ม

แดง จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง และหางนกยูง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ โดยมี inhibition zone ขนาด 9.8, 10.0, 12.0, 20.0, 11.5 และ 11.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังมีสารสกัดเอทานอลจากดอกไม้ชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อดังกล่าวได้แต่เพียงเล็กน้อยและไม่สามารถวัดได้ ได้แก่ เก๊กฮวย คำฝอย แคนแดง ทองหลาง และพวงชมพู

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Escherichia coli* เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน tetracycline 10 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ซึ่งมี inhibition zone เท่ากับ 19.0 มิลลิเมตร พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกกันเกราและบัวหลวง สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวได้ โดยมี inhibition zone เท่ากับ 9.5 และ 12.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albican* และ *Aspergillus niger* เมื่อเทียบกับยามาตรฐาน norfloxacin 10 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร neomycin 5 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร clotrimazole 5

ไมโครกรัม/มิลลิเมตร และ clotrimazole 2.5 มิลลิกรัม/มิลลิเมตร ที่มี inhibition zone เท่ากับ 20.0, 19.5, 28.5 และ 22.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ไม่พบว่าสารสกัดจากดอกไม้มีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสี่ที่ความเข้มข้นดังกล่าว ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 2

3. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี microbroth dilution method

จากการทดลองเมื่อนำสารสกัดที่ความเข้มข้น 19,200 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร ละลายใน 10% DMSO มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ เพื่อหาค่า MIC และ MBC ด้วยวิธี microdilution โดยเลือกทำเฉพาะสารสกัดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตจากการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี agar disc diffusion

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* เทียบกับยามาตรฐาน tetracycline 100 ไมโครกรัม/มิลลิเมตร พบว่าสารสกัดจากดอก

ตารางที่ 2 แสดง Inhibition zone ของสารสกัดจากดอกไม้ 30 ชนิดต่อเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 7 ชนิด

No.	สารสกัด	Inhibition zone ใน agar disc diffusion (มม.)						
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albican</i>	<i>A. niger</i>
1	กันเกรา	+	9.8	9.5	-	-	-	-
2	กุหลาบ	10.5	-	+	-	-	-	-
3	เก๊กฮวย	+	+	-	-	-	-	-
4	ทรงบาดาล	11.0	-	-	-	-	-	-
5	เข็ม (เหลือง)	-	-	-	-	-	-	-
6	เข็ม (แดง)	10.5	10.0	-	-	-	-	-
7	คำฝอย	+	+	+	-	-	-	-
8	แคน (ขาว)	-	-	-	-	-	-	-
9	แคน (แดง)	+	+	-	-	-	-	-
10	จำปี	15.0	12.0	-	-	-	-	-
11	ชบา	-	-	-	-	-	-	-
12	ช้องนาง	-	-	-	-	-	-	-
13	ชุมเห็ดเทศ	13.0	20.0	-	-	-	-	-
14	ดาวกระจาย	+	-	-	-	-	-	-
15	ทองหลาง	+	+	-	-	-	-	-
16	บัวหลวง	16.5	11.5	12.5	-	-	-	-
17	บานบุรี	+	-	+	-	-	-	-
18	บานไม่รู้โรย	-	-	+	-	-	-	-
19	ประดู่	-	-	-	-	-	-	-
20	พวงชมพู	10.5	+	-	-	-	-	-
21	พุทธรักษา	-	-	+	-	-	-	-
22	แพงพวยฝรั่ง (ขาว)	-	-	-	-	-	-	-
23	แพงพวยฝรั่ง (แดง)	11.00	-	-	-	-	-	-
24	มะลิ	-	-	+	-	-	-	-
25	รางจืด	-	-	+	-	-	-	-
26	รำเพย	11.5	-	-	-	-	-	-
27	สุพรรณิการ์	-	-	-	-	-	-	-
28	หางนกยูงไทย	12.0	11.5	-	-	-	-	-
29	อัญชัน	-	-	-	-	-	-	-
30	รักม่วง	-	-	+	-	-	-	-
ยามาตรฐาน		17.8	18.0	19.0	20.0	19.5	28.5	19.0

หมายเหตุ: (-) ไม่พบ Inhibition zone

(+) พบ Inhibition zone เล็กน้อย หรือวัดไม่ได้

กุหลาบ ทรงบาดาล เข้มแดง จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง พวงชมพู
แพงพวยฝรั่งดอกสีแดง รำเพย และหางนกยูงไทย มีค่า MIC
เท่ากับ 600, 300, 2,400, 4,800, 2,400, 2,400, 2,400, 9,600,
1,200 และ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MBC
เท่ากับ 9,600, 4,800, 9,600, มากกว่า 9,600, มากกว่า 9,600,
2,400, 9,600, มากกว่า 9,600, 9,600 และ 9,600 ไมโครกรัม/
มิลลิลิตร ตามลำดับ

การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *E. coli* เทียบกับยามาตรฐาน
tetracycline 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากดอก
กันเกราและบัวหลวง มีค่า MIC เท่ากับ 4,800 และ 1,200
ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MBC เท่ากับ มากกว่า
9,600 และ 9,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *B. Subtilis* ซึ่งทำการศึกษา
เฉพาะ MIC ไม่ได้ศึกษา MBC เทียบกับยามาตรฐาน norfloxacin
100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสารสกัดจากดอกกันเกรา เข้มแดง
จำปี ชุมเห็ดเทศ บัวหลวง และหางนกยูงไทย มีค่า MIC เท่ากับ
2,400, 9,600, 4,800, 1,200, 1,200 และ 4,800 ไมโครกรัม/
มิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงค่า MIC และ MBC ของสารสกัดจากดอกไม้ 30
ชนิดต่อเชื้อจุลินทรีย์ 3 ชนิด

No.	สารสกัด	MIC (มก./มล.)			MBC (มก./มล.)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	กันเกรา	-	4,800	2,400	-	> 9,600
2	กุหลาบมอญ	600	-	-	9,600	-
3	เก็กฮวย	-	-	-	-	-
4	ทรงบาดาล	300	-	-	4,800	-
5	เข้ (เหลือง)	-	-	-	-	-
6	เข้ (แดง)	2,400	-	9,600	9,600	-
7	คำฝอย	-	-	-	-	-
8	แค (ขาว)	-	-	-	-	-
9	แค (แดง)	-	-	-	-	-
10	จำปี	4,800	-	4,800	> 9,600	-
11	ชบา	-	-	-	-	-
12	ช้องนาง	-	-	-	-	-
13	ชุมเห็ดเทศ	2,400	-	1,200	> 9,600	-
14	ดาวกระจาย	-	-	-	-	-
15	ทองหลาง	-	-	-	-	-
16	บัวหลวง	2,400	1,200	1,200	2,400	9,600
17	บานบุรี	-	-	-	-	-
18	บานไม่รู้โรย	-	-	-	-	-
19	ประดู่	-	-	-	-	-
20	พวงชมพู	2,400	-	-	9,600	-
21	พุดซ้อน	-	-	-	-	-
22	แพงพวยฝรั่ง (ขาว)	-	-	-	-	-
23	แพงพวยฝรั่ง (แดง)	9,600	-	-	> 9,600	-
24	มะลิ	-	-	-	-	-
25	รางจืด	-	-	-	-	-
26	รำเพย	1,200	-	-	9,600	-
27	สุพรรณิการ์	-	-	-	-	-
28	หางนกยูงไทย	300	-	4,800	9,600	-
29	อัญชัน	-	-	-	-	-
30	รัก (ม่วง)	-	-	-	-	-

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีการทดลอง 3 ส่วน คือ การเตรียมสารสกัด การ
ทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดย agar disc diffusion method และ
การทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดย microbroth dilution method

ในการเตรียมสารสกัด พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกไม้ที่มี
ปริมาณ % yield สูงสุด คือ แพงพวยฝรั่งดอกแดง (43.89%) และ
ที่มีปริมาณน้อยที่สุดคือ ชุมเห็ดเทศซึ่งมีปริมาณ % yield เป็น
6.47% จากการสกัดสารพบว่าปริมาณสารสกัดเอทานอลของ
ดอกไม้แต่ละชนิดมีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยหากมีสารที่สามารถ
ละลายในเอทานอลได้เป็นปริมาณมากจะส่งผลให้มีปริมาณสารที่
สกัดได้สูง

ผลของการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดย agar disc diffusion
method พบว่าสารสกัดเอทานอลของดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด ไม่พบ
ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *A. niger*, *C. albican*, *P. aeruginosa* และ *S.*
typhimurium ส่วนสารสกัดจากดอกบัวหลวงสามารถยับยั้งเชื้อ
แบคทีเรียได้แบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* และ *B. subtilis*)
และแบคทีเรียแกรมลบ (*E. coli*) ทั้งนี้เนื่องจากในดอกบัวหลวงมี
สารสำคัญที่มีโครงสร้างหลากหลายทั้ง flavonoids, alkaloids และ
tannins¹² สำหรับสารสกัดจากดอกชุมเห็ดเทศมีฤทธิ์ยับยั้ง *B.*
subtilis ได้ดี โดยมี inhibition zone กว้าง 20 มิลลิเมตร ซึ่งอาจ
เนื่องจากชุมเห็ดเทศมีสารสำคัญกลุ่ม flavonoids และ
antraquinones ในปริมาณสูง¹⁴

ในการทดสอบหาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดย microbroth dilution
method พบว่าสารสกัดเอทานอลจากดอกทรงบาดาลและดอกหาง
นกยูงไทยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC ที่
ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งดอก
ทรงบาดาลมีสารสำคัญในกลุ่ม tannins และ terpenoids ที่มีฤทธิ์
ต้านเชื้อแบคทีเรีย ส่วนดอกหางนกยูงไทยมีปริมาณสารสำคัญ
กลุ่ม flavonoids ในปริมาณสูง¹⁴

จากการทดลองฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์เบื้องต้นในสารสกัดเอทา
นอลของดอกไม้ 30 ชนิดโดยวิธี agar disc diffusion นำมา
ทดสอบหาค่า MIC และ MBC โดยวิธี microbroth dilution พบสาร
สกัดของดอกไม้หลายชนิด มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่าง
ๆ จากการเกิด inhibition zone ได้ชัดเจน แต่เมื่อนำมาทดสอบหา
ค่า MIC และ MBC โดยวิธี microbroth dilution สารสกัดเหล่านั้น
บางชนิดอาจไม่สามารถหาค่า MIC หรือ MBC ในช่วงความ
เข้มข้นที่ใช้ทดสอบได้ เนื่องจากสารสกัดอาจต้องใช้ความเข้มข้นที่
มากกว่า 9,600 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จึงสามารถสังเกตเห็นผล
ฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ การสารสกัดเหล่านั้นนำมา
ทดลองโดยวิธี agar disc diffusion ซึ่งใช้เอทานอลเป็นตัวทำ
ละลายได้ แต่เมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี microbroth dilution ไม่
สามารถใช้เอทานอลในการทดสอบได้ เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์จะ
สัมผัสกับเอทานอลโดยตรงทำให้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้น
จึงไม่สามารถทราบได้ว่าการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เกิดจากสารสกัดหรือ

เอทานอล จึงจำเป็นต้องใช้ 10% DMSO เป็นตัวทำละลายแทน ซึ่งการใช้ตัวทำละลายที่ต่างกัน อาจส่งผลต่อการละลายของสารสำคัญในสารสกัดได้ อาจทำให้ผลการทดลองจาก 2 วิธีนี้ไม่สอดคล้องกัน เช่น ดอกบัวหลวงมี inhibition zone ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด (16.5 มิลลิเมตร) แต่มีค่า MIC สูงกว่าสารสกัดจากดอกทรงบาดาลและหางนกยูงไทยที่มี inhibition zone น้อยกว่า (11.0 และ 12.0 มิลลิเมตร) นอกจากนี้ ระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลองทั้ง 2 วิธีที่แตกต่างกันนั้น อาจทำให้ได้ผลการทดลองต่างกัน เนื่องจากวิธี agar disc diffusion ใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบที่มากกว่าวิธี microbroth dilution จึงทำให้สามารถเห็นผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี agar disc diffusion ได้ดีกว่าวิธี microbroth dilution

นอกจากนี้ ในการสังเกตผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต้องอาศัยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสี 2,3,5-tetrazolium sodium โดยหากสารสกัดไม่มีฤทธิ์จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีโดยจะเปลี่ยนจากสีแดงของสารสกัดเป็นสีใส และเนื่องจากงานวิจัยนี้ไม่ได้ศึกษาเพื่อระบุสารสำคัญจากสารสกัดเอทานอลของดอกไม้แต่ละชนิด แต่มีรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับสารเหล่านี้ในส่วนอื่นของพืช เช่น ในบัวหลวงส่วนส่วนราก เกสร และทั้งต้น พบสารกลุ่ม alkaloid^{12,13} ในใบชุมเห็ดเทศพบสารกลุ่ม flavonoid และ terpenoid¹⁴ และในดอกหางนกยูงไทยพบสารกลุ่ม flavonoid¹⁵ ซึ่งกลไกของสารสำคัญดังกล่าว คือ terpenoids สามารถยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กทรอนิกส์ภายในเซลล์ และสาร flavonoids สามารถเกิด adhesion กับเชื้อจุลินทรีย์และเกิด complex กับ cell wall¹⁶ เป็นต้น

จากผลการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากดอกไม้ทั้ง 30 ชนิด พบว่าดอกทรงบาดาลและดอกหางนกยูงไทยมีค่า MIC ต่ำที่สุดในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดังนั้นดอกไม้สองชนิดนี้มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาต่อ โดยการนำไปสกัดแยกสารสำคัญ พิสูจน์เอกลักษณ์ และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ *S. aureus* ของสารเดี่ยว เพื่อพิสูจน์ว่าสารสำคัญชนิดใดที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มากที่สุด และนำโครงสร้างทางเคมีของสารที่มีฤทธิ์ดีที่สุดไปเป็นต้นแบบในการดัดแปลงโครงสร้างและสังเคราะห์อนุพันธ์ให้มีฤทธิ์ดีขึ้นไปอีก สำหรับดอกบัวหลวงซึ่งสามารถรับประทานได้และมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ควรศึกษาความสามารถในการเป็นสารกันเสียในอาหารหรือเครื่องสำอางเพิ่มเติม เพื่อลดการใช้สารสังเคราะห์เป็นสารกันเสียในอาหารหรือเครื่องสำอางในอนาคต

References

- Mekasuwonpradit T, Monthakantikul P, Suthiseesung C, Archananuparp S (eds.). Pharmacotherapy, 2nd ed. Bangkok. Holisting Publishing, 2007. (in Thai)
- Suwanpinit N. Pathogenic bacteria. Bangkok. Department of Biology, Srinakharinwirot University, 2001. (in Thai)
- Damnakkaew K, Rujiwipat W. Annual epidemiological surveillance report, 2003. Bureau of Epidemiology, Ministry of Public Health, Thailand. 2003. (in Thai)
- Joyce ECB, Rebeca PM, Lidiane NB, et al. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(4):387-390.
- Plant Genetic Conservation Project Office. Plant Genetic Conservation Project under the Royal Initiative of her Royal Highness Princess Maha Chakri Sirindhorn. (Accessed on Jun. 7, 2007, at <http://www.rspg.thaigov.net/index.htm>) (in Thai)
- Cosmeticsinfo.org. Rosmarinus Officinalis (Rosemary) extract. (Accessed on Nov. 21, 2015, at <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/rosmarinus-officinalis-rosemary-extract>)
- Moesdarsono M, Yulinah E, Kusmardiyani. Antimicrobial activity of various extracts prepared from *Sesbania grandiflora* bark, International Congress and 49th Annual Meeting of the Society of Medicinal Plant Research. September 2001. Germany.
- NCCLS. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests: Approved standard. NCCLS publication M2-A5. Villanova, USA. NCCLS, 1993.
- NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standard 5th Ed. NCCLS document M7-A5. Wayne, USA. NCCLS, 2000.
- Gattringer R, Nicks M, Ostertag R, et al. Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:651-659.
- Johnson MT. Basic bacterial culture and identification. Indian University School of Medicine. (Accessed on Nov. 27, 2007, at <http://web.indstate.edu/thcme/micro/basic.html>)
- King Mongkut University of Technology-Thonburi. Thai herbs. (Accessed on Jun. 13, 2007, at <http://202.44.14.219/thaiherbkmutt/benefit/info.php?id=15>) (in Thai)
- Smithsonian Institute. Medicinal plants of the Guiana. (Accessed on Dec. 25, 2007, at www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/MedPlantsGui1.pdf)
- Faculty of Pharmacy, Prince of Songkhla University. Southern Center of Thai Traditional Medicine. (Accessed on Jul. 25, 2007, at <http://herbal.pharmacy.psu.ac.th>)
- Boonyaprapassorn N, Chokchaicharoenporn O. Thai traditional herbs (1). Bangkok. Prachachon, 1997. (in Thai)
- Rojas A, Hernandez L, Pereda MR, Mata R. Screening of antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 1992; 35:275-283.